

- 3 Eglitis M A, Kantoff P, Gilboa E *et al.* Science, 1985; **230**: 1395
- 4 Armentano D, Yu S F, Kantoff P W *et al.* J Virol, 1987; **61**: 1647
- 5 Miller A D. Human Gene Therapy, 1990; **1**: 5
- 6 Morgan R A, Cornetta K, Anderson W F. Human Gene Therapy, 1990; **1**: 136
- 7 Boon T. Int J Cancer, 1993; **54**: 177
- 8 Hellstrom K E, Hellstrom I. Cancer Investigation, 1992; **10**: 285
- 9 Robbins P F, Kantor J A, Salgaller M. Cancer Res, 1991; **51**: 3657
- 10 Kantor J, Irvine K, Abrams S *et al.* Cancer Res, 1992; **52**: 6917
- 11 Kawakami Y, Zakut R, Topalian S L *et al.* J Immunol, 1992; **148**: 638
- 12 Ostrand-Rosenberg S, Thakur A, Clements V. J Immunol, 1990; **144**: 4068
- 13 Gansbacher B, Rosenthal F M, Zier K. Cancer Investigation, 1993; **11**: 345
- 14 Connor J, Bannerji R, Saito S. J Exp Med, 1993; **177**: 1127
- 15 Golumbek P T, Lazenby A J, Levitsky H I *et al.* Science, 1991; **254**: 713
- 16 Ogasawara M, Rosenberg S A. Cancer Res, 1993; **53**: 3561
- 17 Peace D J, Chen W, Nelson H *et al.* J Immunol, 1991; **146**: 2059
- 18 Cajot J, Anderson M J, Lehman T A *et al.* Cancer Res, 1992; **52**: 6956
- 19 Lukacs K V, Lowrie D B, Stokes R W *et al.* J Exp Med,

1993; **178**: 343

- 20 Townsend S E, Allison J P. Science, 1993; **259**: 368
- 21 Hock H, Dorsch M, Kunzendorf U *et al.* Cancer Res, 1993; **53**: 714
- 22 Ohe Y, Podack E R, Olsen K J *et al.* Br J Cancer, 1993; **67**: 939
- 23 Ohe Y, Podack E R, Olsen K J *et al.* Int J Cancer, 1993; **53**: 432

Gene Transfer and Genetically-Engineered Tumor Cell Vaccine. Fu Tihui, Xie Zhirong (Department of Biochemistry, Sichuan Cancer Institute, Chengdu 610041, China).

Abstract The newly developed technique of retroviral-mediated gene transfer (RMGT) which mainly involves the transfecting efficiency and safety aspects of RMGT were discussed. And the characteristics and effects of some exogenous genes which could be used to modify the immunogenicity of tumor cells were also classified and presented. Finally, the problems existed both in RMGT and in the preparation of genetically-engineered tumor cell vaccine were analysed.

Key words gene transfer, retroviral vector, immunogenicity, genetically-engineered tumor cell vaccine

视皮层神经元活动的振荡和同步振荡现象*

曾晓东 汪云九 齐翔林

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工开放研究室, 北京 100101)

摘要 视皮层神经元电活动的振荡和同步振荡现象是神经生理学实验的最新发现之一。这一研究成果在认知科学界引起广泛关注。学术界对它在认知心理学上的解释、作用及意义有不同的评论。

关键词 振荡, 同步, 神经元活动, 皮层

* 国家攀登计划资助项目, 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1994-01-18, 修回日期: 1994-09-10

虽然生理学家早就预计, 神经系统在执行认知和运动控制任务时, 神经元的活动表现为某种集体的行为方式. 但是这种集体行为是如何具体进行的? 神经元之间是如何进行相互联系达到集体行为的目标的? 这些问题在 80 年代以前一直未能找到证据确实的回答. 1989 年 Singer 等人用电生理学方法证明, 在猫视皮层上同一功能柱内, 甚至相距 7mm 的不同神经元对于同一物体刺激, 作出同步发放的反应. 他们的工作以及其他研究小组的类似结果, 引起生理学界的极大兴趣, 成为 90 年代初神经科学界最热门的话题之一^[1,2], 可能具有重要理论意义.

本文综述这方面的一些主要研究结果, 以及其在认知活动和神经科学中的作用和意义. 为介绍方便起见, 首先给出国际刊物上使用的一些术语以及分析方法^[3].

在电生理实验中可用单个电极或多个电极进行记录. 由于信号处理方法不同, 可以得到以神经脉冲为表征的单个神经元活动 (single unit activity, SUA) 和多单元活动 (multi-unit activity, MUA), 也可以得到以慢电位为表征的局部场电位 (local field potential, LFP). 研究神经脉冲时, 用自相关直方图 (auto-correlation histogram, ACH) 以分析脉冲间的时间结构, 用“刺激后时间直方图” (post-stimulus time histogram, PSTH) 以表示刺激的时间特性的影响. 当分析不同神经元之间的发放的时间结构时, 则用交相关直方图 (cross-correlation histogram, CCH). 分析 LFP 等连续信号时, 则使用系统理论中的各种分析技术, 最常用的是自相关函数 (ACF) 和交相关函数 (CCF).

1 电生理实验的一些主要结果

Singer 研究组主要以麻醉的猫作为实验对象 (最近也开展对猴的实验研究), 电极主要插在初级视皮层 17 区、18 区以及后内侧上雪氏区 (PMLS). 记录和分析的信号为 SUA, MUA 以及 LFP. 而刺激通常选用运动的光

棒, 并对双眼进行刺激. 其主要实验结果可归纳为以下三个方面^[4,5].

1.1 振荡现象

初级视皮层 17 区细胞的感受野大多具有朝向 (orientation) 选择性, 邻近细胞的感受野其最优朝向是相近的. 因而, 在进行 LFP 和 MUA 记录之前, 需要测定记录电极附近细胞的朝向调谐曲线, 以便使刺激光棒取其最优朝向, 并沿垂直方向前后运动, 这样便可使记录电极附近细胞同时兴奋. 每次实验持续时间为 10s, 其中前 5s 刺激棒朝某一方向运动并要通过所记录细胞的感受野, 后 5s 则沿其相反的方向运动. 以 15—20s 间隔重复上述实验, 重复次数为 10 次. 经对 MUA 进行 PSTH 分析后, 在光棒通过感受野中心时得到尖峰, 但两个方向运动得到的峰值大小通常是不等的.

对细胞反应最强的峰值附近的实验记录做更精细的分析, 发现 LFP 具有 40—60Hz 的节律变化, 并与 MUA 发放有一定的位相关系, 即 LFP 最低点 (负相) 总对应于 MUA 的大量发放. 对 LFP 进行谱分析, 在 40—60Hz 附近得到一尖峰, 这说明能量主要集中于此. 对 MUA 进行自相关分析, 得到了可用 Gabor 函数拟合的衰减的振荡曲线.

值得注意的是, 这种振荡行为是依赖于刺激的, 但又不是由它唯一确定的. 用同一记录电极连续进行数次相同实验, 其结果表明, 开始产生振荡的时间, 振荡周期长短及自相关振幅的高低各不相同, 它们之间交相关图近似为直线, 这说明几次记录的时间结构各不相同, 也就是说这种振荡模式与刺激无关.

实验发现, 这种振荡模式出现在视皮层的许多区域, 如 17 区, 18 区及 PMLS. 在具有不同感受野类型的细胞中均发现了振荡现象, 但比例各不相同, 复杂细胞中比例较高. 从各种不同的刺激参数的改变的实验中, 观察到了它们对所记录的细胞响应中振荡的时间结构的影响.

实验结果表明, 对于有双眼整合作用的细胞, 当分别采用单眼和双眼刺激时, 其两次记

录的 PSTH 图都具有显著的峰,但双眼刺激的峰更宽些.比较它们的自相关图,可以看出双眼刺激的振荡调制幅度明显要强于单眼刺激.此外,若刺激光棒不运动但交替给光或撤光(仍保持双眼刺激),则细胞的响应没有振荡的调制度;若在具有最优朝向的光棒上再叠加一个与之垂直的光棒构成复合刺激,则振荡大为减弱;而用运动的随机点图作为刺激,则诱发的响应仅有一点点节律或几乎没有节律.

以上这些实验可以得出如下的结论:在脑中,神经元活动性的振荡的时间结构确实存在;从 LFP 的振荡现象中,可以看出在记录点附近的神经元反应近似同步;对于具有双眼整合的细胞,双眼刺激具有重要作用;运动刺激对神经元反应的时间结构有着重要作用;不相干的刺激将会改变反应的时间结构.

1.2 同步现象

要考察不同记录点之间神经元活动的相互关系,进而发现神经元群的活动行为,要求对不同的记录点同时记录,然后进行相应的数学分析处理.

实验表明,单个视皮层功能柱内的细胞具有相似的反应特性.由单电极记录到的 MUA 和 LFP 的节律性便可看出单个功能柱内细胞反应是近似同步的.

同一皮层区内不同功能柱之间得到的实验主要包括两种情况:a.相距约在 0.4—2mm 之间的功能柱,它们具有重叠的感受野.当用单一光棒刺激时,记录细胞同时兴奋并容易出现同步,而且与各自的感受野的最优朝向无关.b.相距在 2mm 以上的两个功能柱,它们的感受野不重叠.用两个光棒分别刺激这两群细胞使其兴奋,从交相关分析结果表明,具有相似感受野朝向的功能柱间容易出现同步现象,其交相关振幅与功能柱之间的距离成反比.通常认为,具有相似朝向和运动方向的刺激容易被认为是属于同一种物体的,因而相对应的神经元反应之间可实现同步,以便于组成表征物体的神经元群.

许多实验在不同皮层区域之间(如视皮层

17 区与 18 区,17 区与 PMLS,以及大脑的左右半球 17 区)发现了类似的同步现象.Singer 等人发现,这种皮层不同区域间的同步是通过皮层间的相互连接(cortico-cortical connections)实现的.他们切断皮层连接后,功能柱的振荡现象仍然存在,但不同皮层间同步现象消失.这表明这种同步现象不是由于来自丘脑的共同输入引起的,而是一种皮层的动态的连接特性.

1.3 对不同的刺激条件出现的同步

要识别不同物体,分别形成相应的神经元群,要求功能柱之间能根据不同的刺激条件实现同步或去同步.这种依赖于刺激特性(stimulus-dependent)的反应主要有:

1.3.1 具有重叠感受野的功能柱之间

Singer 等人在实验中选取了四个感受野重叠、具有不同最优朝向的功能柱.三次实验中,分别使用不同朝向的光棒刺激,感受野最优朝向与刺激相近的两个功能柱(三次实验中分别为记录点 1—3, 2—4, 2—3)有较大反应,且同步.同时使用前两次实验所用的刺激,则在记录点 1 与 3, 2 与 4 之间反应仍然同步,但 2 与 3 之间反应没有相关性.这样,“冲突”的刺激把细胞(功能柱)按其感受野最优朝向分成两群,每群内反应同步,而群之间无相关性.

1.3.2 感受野不重叠的功能柱之间

Singer 小组在实验中选取皮层上分离 7mm 的两个记录点,它们具有相同的最优朝向,且其感受野准直共线.在三次实验中,分别用一个长棒、两个沿相同方向运动的短棒及两个沿相反方向运动的短棒作刺激.三次实验中,细胞均有强烈的发放,但它们的互相关图却有很大差异.用一根长棒刺激时,两个记录点有很强的同步发放;用两根沿相同方向运动的短棒刺激,两棒之间有一定距离,此时交相关图表现为弱振荡,这说明同步变弱;若两根短棒沿相反方向运动,则没有同步现象发生.

以上现象表明,这种同步机制反映了刺激的全局特性,用来从刺激图象中提取相关信息,形成不同的神经元群,而神经元群是由位相关

系定义的. Singer, Gray 等人在随后三年的工作中, 继续开展深入研究, 使用新的统计分析技术, 测量到同步振荡的持续时间在 100—900ms 范围内变动, 相位差在 +3ms 到 -3ms 之间, 频率为 40—60Hz. 这些结果表明, 有关神经元群体之间的同步振荡的启动和终止是相当快速的.

值得注意的是, Eckhorn 研究组也在进行同样的研究, 得到了与 Singer 等人类似的结果^[6]. 此外, 1993 年他们报道在清醒猴的初级视皮层上记录到较高频率 (70—80Hz) 的同步振荡^[7], 这一数据比猫的结果要高些. 同年, Singer 组也在恒河猴上进行实验, 但他们发现振荡的持续时间短, 而振荡频率变化较大. 1992 年 Murthy 首次报道清醒的猴的运动皮层上记录到 25—35Hz 的同步振荡, 这种现象出现于手指和眼注意相配合的作业中. Jagdeesh 等 (1992) 在脑片上进行工作也观察到 40Hz 左右的膜电位的振荡.

2 理论意义

神经元电活动中振荡和同步振荡现象可能与认知科学、神经科学乃至智能机器研制中的一些问题有内在联系, 因而具有重要的理论意义. 现按文献中讨论较多的几个方面, 综述如下.

2.1 神经信息的编码

神经科学在本质上是研究环境信息在神经系统内部的编码表达和信息处理过程. 在神经科学的发展史中, 神经信息的编码问题一直是学术界关心的焦点, 也是逐步完善发展的过程. 1993 年出版的“神经科学年评”(Annual Review of Neuroscience) 中就有若干篇文章涉及这一问题^[8]. 本文作者之一在 1992 年和 1993 年发表的论文中也曾介绍过, 并提出一个形式化的理论表达方式, 讨论“群体动态编码”的可能性^[9,10]. 但是当前电生理实验中仍沿用的单细胞神经脉冲发放的观点, 来自于 1929 年 Adrian 的“同构假设”. 许多电生理学家已经感到这一假设的局限性, 无法圆满解释

实验结果, 开始提出一些新的观点. Abeles 主要依据听觉电生理实验提出多个神经元同步发放 (synfire) 的动态观点^[11]. Malsburg 从理论上预计神经元之间相关活动的重要意义^[12]. Freeman 在兔嗅球的多电极记录中提出脑功能态的动态转换理论, 已经相当明确地表达了神经元群体动态编码的思想. 我们在 1991 年提出神经信息波的观点, 并具体指出在初级视觉中带时间变量和时间参数的广义 Gabor 函数作为时空信息波的合理性. 上面提到的一些结果, 特别是视皮层上不同神经元之间可能产生的同步振荡, 为神经信息的“群体动态编码”的理论观点, 提供了强有力的实验依据.

2.2 图形-背景分离问题

50 年代前后, 视觉电生理实验记录到单个神经元对图形的某些特征有特异反应. 在大量的研究工作基础上, 形成 Barlow (1972) 的“特征检测”理论. 这个理论可以很好地解释模式识别中最初阶段的图形特征分解问题. 但是, 图形识别和感知功能还需要把不同地点的不同特征联系起来形成一个统一整体. 即所谓特征的 联系 组合 问题 (feature binding problem). 这个问题用 Barlow 理论中的“老祖母细胞”是无法完成的. 因为这一理论无法解决两个重要问题: 其一: 随着特征数目的增加, 老祖母细胞数会“组合爆炸”; 其二: 由于神经元自然死亡产生的结构上的鲁棒性 (robust) 问题. 因此, 这种机械还原论的理论与实际情况不符. Hebb 提出神经元群体的概念, 他定义的神经元群体是由平均发放率同时提高的那些神经元组成. 这样, 同一神经元在不同时刻可属于不同的神经元群体, 用于识别不同的特征和物体, 从而避免组合爆炸的困难. 但是当出现多个物体时, 皮层上几个神经元群体同时活动, 又会出现相互混淆重叠的困难. 同步振荡不同于 Hebb 的平均发放率概念, 强调时间结构和动态过程, 具有更强的编码能力. Singer 设计实验用一条长棒落到相距甚远的二个神经元的感受野内, 只要它们感受野的最优朝向一致而准直, 就能诱发出强烈的同步振

荡,通过同步振荡把它们统一为整体.

2.3 注意 (Attention) 的神经机制

动物的感觉系统从外界环境同时接受许多信息,而神经系统必须从中选择一些信息作更多的分析处理.人在观看一幅场面很大的画面时,视线(代表注意点)有个转移过程.该过程可比拟为注意的探照灯 (searchlight).但是这种选择性活动的神经机制是什么,仍在探索之中.有证据表明注意的神经控制中心在额叶,也有人认为在丘脑.电生理发现视皮层的振荡的持续时间为 100ms 量级上,与人眼注视点的周期相近.因此,同步振荡可能作为控制视线转移的神经生理学线索.关于注意的理论模型,近年来陆续有所发表.如,影响面较大的 Treisman 提出的注意的一种新理论(特征整合理论)^[13,14].诺贝尔奖获得者 Crick 也提出过一个注意的探照灯模型^[15],该模型的依据是丘脑中某些细胞瞬态性组合产生神经脉冲的簇放(bursting),这种簇放又去快速调制形成不同特性(如:水平线、绿色等等)的新的神经元群体.簇放脉冲控制探照灯转移.显然神经元电活动的振荡和同步振荡可能作为这种“簇放”的神经机制.不过,Crick 模型中认为注意的控制中心在丘脑,现在还有许多争议.

3 讨 论

许多电生理研究者很早就观察到 50Hz 左右的振荡,但他们当初倾向于把它看作市电干扰,或想方设法加以滤掉.Singer 等人的工作最初也被认为是伪迹而不予发表.有的研究者认为清醒的猫身上难以记录到这种现象,从而怀疑同步振荡是麻醉引起的副作用.在其他的动物身上(例如猴),有的实验者得到否定的结果.在不同功能的皮层区之间的同步振荡的实验进行的工作很少,不足以得出结论认为皮层各区间用同步振荡来通信联络.至于视皮层上的同步振荡的产生机制纯粹是皮层上神经线路造成的,还是丘脑-皮层相互作用的结果,现在还不清楚.此外,当前关于这一现象研究论文中使用的术语、概念、实验方法、分析手段等

等都尚未统一,仔细推敲起来尚有许多模糊的地方.

视皮层上神经元之间存在同步振荡现象,之所以引起计算神经科学家的巨大兴趣,在于它可能作为神经编码的一种可能方式,为神经科学从还原论的束缚下解脱出来,逐渐形成群体动态编码的思想,为感知研究中的图形识别、注意机制的理论探索提供了实验证据.但是,在取得第一步的理论上可能的解释后,接踵而来的是一连串的问题,如:信息加工的后一步骤如何利用这种同步振荡现象;脑的另外一些高级功能(如学习、记忆)是否也使用类似方法进行工作,等等.这些问题都需从理论、实验两方面进行研究.

神经电活动振荡和同步振荡现象发现以后,在人工神经网络、神经计算机等信息科技界引起强烈反响,有关国际会议以及专业刊物上发表许多数学模型和计算机模拟研究.一个纯粹的神经电生理学的基础研究,在工程技术界引起如此快速和强烈的反应,表明神经系统中这种信息处理方式,将会对新型信息系统(包括智能机)的研究以新的启发.

参 考 文 献

- 1 Barinag M. Science, 1990; **249**: 856
- 2 Stevens C F. Nature, 1993; **361**: 500
- 3 Aertsen A, Arndt M. Current Opinion in Neurobiology, 1993; **3**: 586
- 4 Engel A K, König P, Kreiter A K *et al.* TINS, 1992; **15**: 218
- 5 Gray C M, Engel A K, König P *et al.* Vis NeuroSci, 1992; **8**: 337
- 6 Eckhorn R, Bauer R, Jordan W *et al.* Biol Cyber, 1988; **60**: 121
- 7 Eckhorn R, Frien A, Bauer R *et al.* Neuroreport, 1993; **4**: 243
- 8 Cowan W M. Annual Review of Neuroscience, 1993; **16**
- 9 汪云九,夏发生.自然,1992; **12**: 921
- 10 汪云九.见:张作生主编,生物医学工程前沿.合肥:中国科技大学出版社,1993: 26
- 11 Abeles M. Local cortical circuits. Berlin: Springer-Verlag, 1982
- 12 Malsburg C. Biol Cybern, 1986; **54**: 29

- 13 Triesman A. Psychological review, 1990; 97: 460
14 王 甦. 见: 王 甦等著, 当代心理学研究. 北京: 北京大学出版社, 1993: 1
15 Crick F. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 4580

The Oscillation and Synchronous Oscillation of Neuronal Activities in Visual Cortex. Zeng Xiaodong, Wang Yunjiu, Qi Xianglin (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Laboratory of Visual Information Processing, Beijing 100101, China*).

Abstract One of the important progress discovered recently in neuroscience is oscillation and synchronous oscillation in the visual cortex, which raises wide attentions in cognitive society. There are different opinions on its explanation, effect and significance in cognitive science.

Key words oscillation, synchronization, neuronal activity, cortex

昆虫杆状病毒表达系统中阳性重组病毒的筛选

朱反修 王福山 齐义鹏

(武汉大学病毒学研究所, 武汉 430072)

摘要 近年来, 随着杆状病毒表达系统的普遍应用, 阳性重组病毒筛选方法也有了很大的改进, 从过去的经验性的 ocu^+/ocu^- 空斑表型筛选发展到根据颜色差异, 药物抗性, 抗生素抗性等等筛选重组病毒. 同源重组过程也可在大肠杆菌或酵母甚至体外进行, 大大提高了重组率, 由于重组率是如此之高, 有些方法可以免去繁琐的空斑选择, 很快得到重组病毒的纯培养. 文章对各种筛选方法进行了比较, 并指出各自的优缺点.

关键词 杆状病毒, 筛选方法, 外源基因表达

自从 1983 年 Smith 等^[1]首次使用杆状病毒表达系统表达 β -干扰素以来, 杆状病毒表达系统取得了丰富的成果, 到目前为止已表达了数以百计的各种生物活性分子. 因为其表达量大, 后加工系统完备, 使用安全等特点而备受人们的青睐. 但由于其筛选鉴定重组病毒需一定的经验, 对非病毒学工作者来说费时费力, 在使用上受到一定限制.

杆状病毒由于基因组庞大, 外源基因的克隆不能通过酶切连接的方式直接插入, 而必须通过转移载体的介导, 即将极晚期基因, 比如多角体蛋白基因 (ocu) 及其边界区克隆入细菌的质粒中, 消除其编码区和不合适的酶切位点, 保留其 5' 端对高效表达必须的调控区, 并在其下游引入合适的酶切位点供外源基因的插入,

即得到转移载体. 将要表达的外源基因插入其启动子下游, 再和野生型 AcNPV DNA 共转染昆虫细胞, 通过两侧同源边界区在体内发生同源重组, 使多角体蛋白基因被外源基因取代, 而将外源基因整合到病毒基因组的相应位置. 由于 ocu 基因被破坏, 不能形成多角体, 这种表型在进行常规空斑测定时可以和野生型的具有多角体的病毒空斑区别开来, 这就是最初的筛选重组病毒的方式^[2,3]. 但由于重组比例低 (0.1%—1%, ocu^+/ocu^-), 表型差别不显著, 应用上有一定困难, 为此有不少人在这方面进行探索, 取得了可喜的进展.